Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. K. Kochsiek

KNOCHENSTOFFWECHSEL BEI URÄMIE

Untersuchungen an urämischen Ratten unter dem Einfluß eines variierenden Proteinangebotes

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Stephan Jank
aus Schleswig

Würzburg, 30. Januar 1981

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. K. Kochsiek

KNOCHENSTOFFWECHSEL BEI URÄMIE

Untersuchungen an urämischen Ratten unter dem Einfluß eines variierenden Proteinangebotes

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Stephan Jank
aus Schleswig

Würzburg, 30. Januar 1981

Referent : Professor Dr.med.E. HEIDBREDER

Korreferent: Professor Dr.med. K. KOCHSIEK

Dekan : Professor Dr.med. K.-H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 1.6.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

			Seite
1.	EINLEITUNG		3
2.	METHODIK		5
	2.1	Versuchstiere	5
	2.2	Tierexperimentelles Modell: 5/6-Nephrektomie	5
	2.3	Kollektivzusammensetzung und Fütterungsbedingungen	6
	2.4	Versuchsablauf	12
		2.4.1 Knochengewebsentnahme und -präparation	12
		2.4.2 Röntgenuntersuchung und histologische Untersuchungen	12
	2.5	Analytische Methodik	15
		2.5.1 Bestimmung der Elektrolyte Calcium, Magnesium und anorg. Phosphat im Serum und im Knochen	15
		2.5.2 Bestimmung des Harnstoff-N im Serum	15
		2.5.3 Bestimmung des Hydroxyprolins im Knochen	15
	2.6	Statistische Verfahren	16

			Seite
3.	ERGEBNISSE		17
	3.1	Gewichtsverlauf	17
	3.2	Blutchemische Befunde	20
	3.3	Knochenchemische, röntgenologische und histologische Ergebnisse	24
4.	DISKUSSION		34
	4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	34
	4.2	Knochenstoffwechsel bei Proteindepletion	35
	4.3	Das Skelett bei Urämie	37
	4.4	Aminosäurensubstitution bei Urämie: Kurativer oder metabolischer Effekt?	38
5.	ZUSAMMENFASSUNG		41
6.	LITERATUR		44
7.	ANHANG		49

1. EINLEITUNG

Im komplexen Muster der histologischen Veränderungen der renalen Osteodystrophie spiegeln sich vielfältige pathogenetische Prozesse des gestörten Knochenstoffwechsels bei Urämie wider, die neben hormonalen Veränderungen schwere strukturelle Schäden des Skelettes auslösen. In diesem Sinne bezeichnet der Terminus "renale Osteodystrophie" ein Nebeneinander metabolischer Störungen der Parathormon-Vitamin D_3-Interaktion, des Calcium- und Phosphathaushaltes sowie die Folgen der chronischen Aberration im Säure-Basen-Haushalt für den Mineralbestand des Skeletts, außerdem das morphologisch faßbare Substrat von Osteomalazie und Ostitis fibrosa, in einzelnen Fällen auch das einer Osteoporose.

Als initialer Stimulus dieser Veränderungen gilt der Verlust an Nierenparenchym, konsekutiv gehen die Phosphat- und Wasserstoffionenausscheidung zurück, der Vitamin D-Stoffwechsel wird auf der renalen Ebene bei der Konversion von 25-Hydroxy-Vitatmin D_3 zum 1,25-Dihydroxy-Vitamin D_3 gestört. Es etabliert sich ein chronischer Calciummangelzustand, der zu einer Dauerstimulation der Nebenschilddrüsen führt. Es stellen sich einerseits erhebliche Mineralisationsstörungen des Osteoids unter dem Bild einer Osteomalazie ein, andererseits leiten durch Parathormon aktivierte Osteoklastenverbände eine fortschreitende Osteolyse ein. Mobilisiertes Calcium kann bei hohem Calcium-Phosphat-Produkt in Form metastatischer Verkalkungen in extraossären Geweben weitere Schäden auslösen.

Der Therapieansatz der renalen Osteodystrophie ist ebenso vielschichtig wie ihre Entstehungsbedingungen: Phosphatrestriktion, Calciumsubstituion, Behandlung der Azidose sowie in Einzelfällen

Gabe von Vitamin D_3 sind die wichtigsten therapeutischen Forderungen. Die fortschreitende Niereninsuffizienz zwingt aber auch zu einer schrittweise anzupassenden Reduktion der alimentären Proteinzufuhr, die Folgen dieser Proteindepletion auf den Knochenstoffwechsel sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Studie wurde der Frage nachgegangen, ob und welche Veränderungen im Knochenstoffwechsel bei Malnutrition einerseits und chronischer Niereninsuffizienz andererseits tierexperimentell verifizierbar sind. Insbesondere galt das Interesse der Frage, ob durch modifizierte proteinarme Diätformen, wie sie in letzter Zeit bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt werden, eine Besserung des katabolen Knochenstoffwechsels zu erreichen ist.

Bei der sog. Schweden-Diät wird Eiweiß ohne Selektion hochwertiger Proteine dem chronisch Nierenkranken angeboten, der Bedarf an essentiellen Aminosäuren wird in Form industriell hergestellter Preßlinge aus essentiellen Aminosäuren oder deren Ketoanalogen zusätzlich angeboten. Es erschien deshalb besonders sinnvoll, den Effekt dieser elementaren Bestandteile des Proteinstoffwechsels auf den Knochen zu untersuchen.

2. METHODIK

2.1 VERSUCHSTIERE

Zur Prüfung der Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Skeletts unter dem Einfluß der Urämie wurden weibliche Wistar-Ratten (Versuchstieranstalt Ivanovas, Kißlegg) mit einem Körpergewicht von durchschnittlich 165 g $\pm$ 5 g untersucht. Die Tiere wurden zunächst 6 Wochen lang zu viert in größeren Käfigen gehalten. Eine Woche vor Aufnahme der eigentlichen Diätfütterung wurden sie einzeln in kleinere Käfige umgesetzt und hier bis zum Ende der Fütterungsstudie gehalten.

2.2 TIEREXPERIMENTELLES MODELL

Zur Erzeugung einer urämischen Stoffwechsellage wurden die Tiere einer 5/6-Nephrektomie mit späterer Nachresektion unterzogen, die Tiere der Kontrollkollektive wurden unter Belassung beider Nieren scheinoperiert.

Die 5/6-Nephrektomie wurde in Äthernarkose durchgeführt; über einen dorsalen, medianen Haut- und paravertebralen Muskelschnitt wurden die Nieren freigelegt, die Nierenkapsel unter Schonung der Nebennieren vom Organ gelöst und die rechte Niere nach Unterbindung des Ureters und des Gefäßpols entfernt; an der linken Niere wurden 2/3 des Parenchyms abgetragen. Nach der Operation erfolgte der Ver-

schluß der Operationswunde schichtweise. In einer zweiten Operation nach 14 Tagen wurde mit einem Elektrokauter (Erbotom K 25) regeneriertes Nierenrindengewebe entfernt. 36 nephrektomierte Ratten dienten als urämisches Vergleichskollektiv eines frei ernährten (n = 24) und eines mangelernährten (n = 36) Rattenkollektivs.

2.3 KOLLEKTIVZUSAMMENSETZUNG UND FÜTTERUNGSBEDINGUNGEN

Die 96 Ratten dieser Diätstudie wurden - je nach Zusammensetzung der Diät - folgenden Kollektiven zugeteilt:

I. einem frei ernährten Kollektiv (n = 24),
II. einem mangelernährten Kollektiv (n = 36) und
III. einem urämischen Kollektiv (n = 36).

Alle Ratten erhielten in der 2., nach 8 Wochen einsetzenden Fütterungsphase als Grundnahrung eine proteinarme Diät, die im 1. Kollektiv ad libitum verzehrt wurde, im 2. Kollektiv jedoch nur in äquivalenter Menge der von den urämischen Ratten am Vortage verzehrten Rationen (Paarfütterung). Durch weitere Diätmodifikation untergliederten sich diese 3 Hauptkollektive in jeweils 3 vergleichbare Subpopulationen, indem die proteinarme Diät einerseits mit essentiellen Aminosäuren, andererseits mit ihren Ketoanalogen angereichert wurde.

Diagrammatisch läßt sich die Kollektivbildung wie folgt darstellen (Abb. 1):

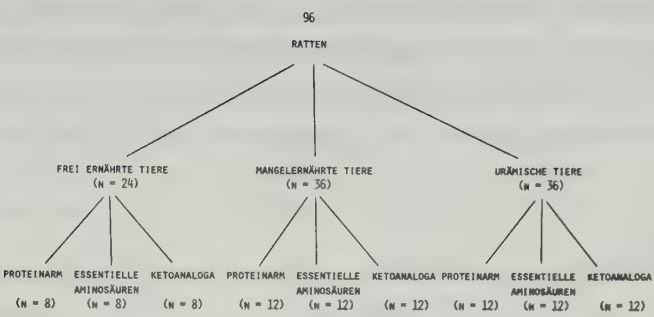

Abb. 1: Zusammensetzung der Tierkollektive

Im Text und in den weiteren Abbildungen verwendete Abkürzungen:

NE	:	Frei, bzw. normal ernährte Ratten
ME	:	mangelernährte, zu den urämischen Tieren paargefütterte Ratten
U	:	urämische, 5/6 nephrektomierte Ratten
PA	:	proteinarm ernährte Ratten
EAS	:	Zusatz von essentiellen Aminosäuren zum Futter
KA	:	Zusatz von Ketoanaloga zum Futter

Als Basisdiät wurde die von Hartroft und Eisenstein angegebene und von Möhring (23) modifizierte Diät verwendet.

1 kg enthält:

Casein	60 g
Mazolaöl	70 g
Salzmischung	46, 98 g
Vitaminmischung	20, 0 g
Methionin	5, 0 g
Stärke	140, 00 g
Kleie	50, 00 g
Dextrose ad 1000	608, 02 g

Der Caseinanteil betrug jedoch aus Gründen der Proteindepletion nur 60 g pro 1000 g der von Möhring verwendeten Kostform. 1 kg dieser Diät wurde mit 375 ml Leitungswasser versetzt und in der o. a. Modifikation den einzelnen Subpopulationen verfüttert.

Die Salzmischung hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	13, 3 g
K_2PO_4	9, 43 g
$MgSO_4 x 7H_2O$	8, 20 g
$CaCO_3$	9, 04 g
$Ca_5 (PO_4)_3OH$	6, 45 g
$FePO_4$	0, 523 g
$CuSO_4 x 4 H_2O$	0, 03 g
$MnSO_4$	0, 008 g

Die Vitaminmischung wurde aus folgenden Zutaten hergestellt:

Vitamin A	2, 0 g
Vitamin C	45, 0 g
Vitamin D	0, 01 g
Vitamin E	5, 0 g
Vitamin B_2	1, 0 g
Vitamin B_6	1, 39 g
Vitamin B_{12}	0, 00135 g
Inositol	5, 0 g
Cholinchlorid	75, 0 g
Menadion	2, 25 g
Paraminobenzoesäure	5, 0 g
Nikotinsäure	4, 5 g
Calcium-Pantothenat	3, 0 g
Biotin	0, 02 g
Folsäure	0, 09 g
Dextrose ad. 1000	850, 74 g

Das essentielle Aminosäuren-Gemisch wurde freundlicherweise von der Fa. Pfrimmer, Erlangen, zur Verfügung gestellt. 100 g dieses Gemisches (Trockensubstanz) enthielt:

L-Histidin	22, 13 g
L-Lysinmonoacetat	36, 89 g
L-Threonin	27, 46 g
L-Tryptophan	13, 52 g

1 g dieses Aminosäuren-Gemisches wurde mit 6 ml Tylose^{R} (1 %) gut vermengt. Die Tiere der 3 Subpopulationen erhielten täglich 600 mg dieses Gemisches pro kg Körpergewicht, d. h. es wurde täglich 0, 72 ml dieses Gemisches (bezogen auf ein gerundetes mittleres Tiergewicht von 200 g) mit der Schlundsonde appliziert.

Auch das Gemisch aus Ketosäuren und essentieller Aminosäuren wurde von der Fa. Pfrimmer, Erlangen, uns freundlicherweise überlassen. Es wurde ein von Walser (36) angegebenes Gemisch aus 4 Analoga der Aminosäuren als Calciumsalze in Verbindung mit 4 essentiellen Aminisäuren verwendet. 100 g Trockensubstanz dieses Gemisches enthielt:

Keto-Isoleucin (Calciumsalz)	20, 0 g
Keto-Leucin (Calciumsalz)	25, 0 g
Keto-Valin (Calciumsalz)	26, 4 g
Keto-Phenylalanin (Calciumsalz)	13, 6 g
Hydroxy-Methionin (als Calciumsalz)	15, 0 g
außerdem:	
L-Histidin	3, 86 g
L-Lysinmonoacetat	6, 43 g
L-Threonin	4, 79 g
L-Tryptophan	2, 36 g.

1 g dieses Gemisches wurde mit 6 ml Methylzellulose (1 %) gut vermengt. Die Tiere dieser 3 Subpopulationen erhielten täglich 600 mg/kg Körpergewicht dieses Gemisches, d.h. es wurde täglich 0,72 ml - bezogen auf ein gerundetes mittleres Tiergewicht von 200 g - per Schlundsonde verabreicht. Da der metabolische Umsatz bei Ratten 4 x höher ist als beim Menschen, wurde den Versuchstieren ein entsprechend proportioniertes Aminosäuren- bzw. Keto-Aminosäuren-Gemisch angeboten.

Nach 7-wöchiger Adaptation der Tiere an die Tierhalte- und -fütterungsbedingungen wurde in der 8. Woche zunächst allen Tieren proteinarme Diät ad libitum jeweils für 12 Tage verabreicht. Erst danach erfolgte die Gabe der spezifischen, je nach Subpopulation definierten Kostform für weitere 6 1/2 Wochen.

Die Aminosäuren- und Ketosäurengemische wurden mit der Schlundsonde gefüttert, um die Aufnahme der festgelegten Menge sicherzustellen. Leitungswasser stand jederzeit ad libitum zur Verfügung. Während der Diätperiode wurde jeden 2. Tag das Körpergewicht bestimmt.

Über den zeitlichen Ablauf der Fütterungsperiode informiert folgendes Schema (Abb. 2).

In einer zweiten Studie über röntgen- und histologische Veränderungen bei experimenteller Urämie wurde eine Untersuchungsreihe mit ähnlichen Bedingungen wie oben erstellt.

Die 64 Tiere (weibliche Sprague-Dawley-Ratten, Ausgangsgewicht 201 Gramm $\pm$ 11,2 Gramm) wurden ebenfalls in 3 Kollektive eingeteilt:

I. einem frei ernährten Kollektiv (n = 21),
II. einem mangelernährten Kollektiv (n = 25) und
III. einem urämischen Kollektiv (n = 18).

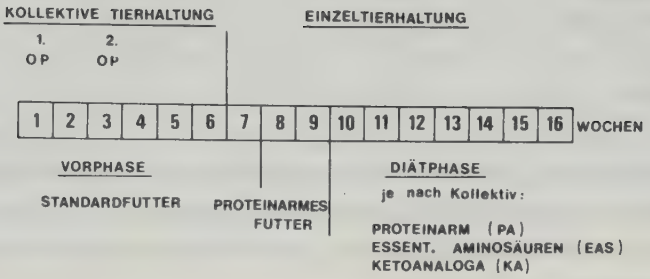

Abb. 2: Zeitlicher Ablauf des Fütterungsversuchs:
1. OP und 2. OP bedeuten 5/6-Nephrektomie und Nachresektion

Alle Tiere erhielten in der 2. nach 5 Wochen einsetzenden Fütterungsphase eine proteinarme Diät (5 % Proteingehalt). Die Fütterungsbedingungen entsprachen denen der obigen Studie (Kollektiv I bekam Futter ad libitum angeboten, Kollektiv II wurde zu den urämischen Ratten paargefüttert).

Durch weitere Diätmodifikationen untergliederte sich jedes dieser 3 Hauptkollektive in jeweils 2 Subpopulationen, indem die proteinarme Diät für je 1 Subpopulation mit EAS angereichert wurde. Das proteinarme Futter wurde in gepreßter Pulverform angeboten. Die essentiellen Aminosäuren wurden den Tieren mittels Schlundsonde als Suspension (eine Tab. EAS oral, Fresenius Bad Homburg, in 30 ml H_2O) zugeführt. Die täglich applizierte Menge enthielt pro Tier:

	mg
L-Isoleucin	1,97
L-Leucin	2,97
L-Lysin	2,5
L-Methionin	1,73
L-Phenylalanin	2,03
L-Threonin	1,77
L-Valin	2,5
L-Histidin	1,27
L-Tyrosin	1,00

Nach fünfwöchiger Adaptationszeit an die Tierhalte- und Fütterungsbedingungen bei Standarddiät erfolgte die Umstellung auf proteinarme Diät und die Gabe der spezifischen, je nach Subpopulationen definierten Kostformen für 6 Wochen.

2.4 VERSUCHSABLAUF

Nach Abschluß der 7-wöchigen Fütterungsperiode wurden die Tiere dekapitiert und für die Analyse blutchemischer Parameter entblutet. Die Extremitäten wurden exartikuliert und bis zur chemischen Aufarbeitung bei minus 30°C tiefgefroren.

2.4.1 Knochengewebsentnahme und -präparation

Es wurde jeweils der linke Femur untersucht. Nach sorgfältigem Ablösen der Haut und der Weichteile wurde der Femur in toto gewogen und anschließend bei 100°C 24 Stunden lang getrocknet (Trockengewicht in g).

Ein Aliquot des getrockneten Knochens (> 250 mg) wurde zur Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes abgetrennt. Das restliche Knochengewebe wurde mit einer Methanol-Chloroform-Mischung (1:2)

24 Stunden lang entfettet und anschließend zerkleinert: Der in einem Bad aus Azeton und Trockeneis tiefgefrorene Knochen wurde in einem tiefgekühlten Mörser mit einer entsprechenden Menge zertrümmerten Trockeneises so fein wie möglich mit einem tiefgefrorenen Stößel zerkleinert. Dieses Gemenge wurde erneut bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend in einem Muffel-Ofen (600°C, 18 Stunden lang) verascht. Die Knochenasche wurde gewogen (Aschgewicht in g) und aus der Differenz von Trockengewicht und Aschgewicht der Gehalt an organischen Substanzen (Matrixgewicht in mg) errechnet. Nach Lösung der Knochenasche in konzentrierter Salzsäure wurde der Calcium- und Phosphat-Gehalt des Knochens bestimmt.

2.4.2 Röntgenuntersuchung und histologische Untersuchungen

Zur standardisierten röntgenologischen Bestimmung verschiedener Strukturgrößen des Knochens wurde der rechte Femur (der Ratten aus der 2. Versuchsreihe) freipräpariert und auf einer dünnen Kunststoffplatte so befestigt, daß der Condylus medialis und lateralis sowie der Trochanter major jeweils Auflagepunkte waren. Der Röhrenabstand wurde so eingestellt, daß sich der Knochen in einem Maßstab von 1 : 2,5 auf dem Röntgenfilm (Kodak Safety Film 3, Einstellung: 12 mAs, 50 kV, 0,013 s) abbildete. Von jedem Femur wurden in der Mitte des Knochens der Diaphysendurchmesser, beide Kompaktabreiten sowie der Durchmesser des Markraumes mit einer Meßlupe (Meßgenauigkeit: $\pm$ 0,1 mm) bestimmt.

Aus diesen Parametern wurde der sogenannte Femoral Core (Barnett und Nordin, 1) $FC = \frac{T^2 - M^2}{T^2}$ errechnet. (T = totaler Diameter, M = medullärer Diameter, Abb. 3):

RÖNTGENMORPHOMETRISCHE PARAMETER

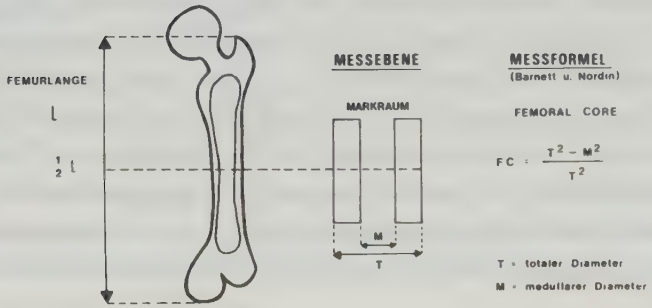

Abb. 3: Schematisierte Darstellung der röntgenmorphometrischen Parameter:
in Höhe der halben Femurdistanz L wurden der totale (T) und der medulläre (M) Diameter gemessen und nach der von Barnett und Nordin (1) angegebenen Formel errechnet

Zur histologischen Untersuchung der proximalen Tibiaepiphysenfuge wurde dieser Knochenabschnitt mit einem Fotomikroskop (Carl Zeiß, C 35, Filmmaterial: Agfachrom professional L 50) bei 40-facher Vergrößerung fotografiert, um die Struktur des Knorpels und die Größe der Epiphysenfuge quantitativ genauer zu beurteilen[1].

---

1 Für die Anfertigung der histologischen Präparate sind wir Herrn Professor Dr. W. Romen, Patholog. Institut der Universität Würzburg, zu besonderem Dank verpflichtet.

2.5 ANALYTISCHE METHODIK

2.5.1 Bestimmung der Elektrolyte Calcium, Magnesium und anorg. Phosphat im Serum und im Knochen

Der Calcium- und Magnesiumgehalt wurde mit dem Atomabsorptionsspektrometer (AAS Beckman) bei 422 nm (Calcium) und 285 nm (Magnesium) bestimmt. Die Ionisierungsanregung erfolgte mit Strontiumchlorid. Die Konzentration des anorganischen Phosphors wurde mit einem Reagenzsatz der Firma Merck AG, Darmstadt, nach Raabe (26) ermittelt.

2.5.2 Bestimmung des Harnstoff-N im Serum

Die Harnstoff-N-Konzentration im Serum wurde am Technicon Autoanalyzer nach der Diacetylmonoxim-Methode nach Marsh et al. (21) gemessen.

2.5.3 Bestimmung des Hydroxyprolins im Knochen

Diese Bestimmung erfolgte nach einem colorimetrischen, von Firschein und Shill (5) angegebenen Verfahren. 250 mg getrocknete Knochenfragmente wurden in einem Mörser zu feinem Knochenmehl pulverisiert und anschließend 6 Stunden lang bei $130^{\circ}C$ in 4 ml 6 N HCl hydrolysiert. Nach Abkühlen und Filtern wurden 0,2 ml dieses Hydrolysats mit 0,8 ml Na_2CO_3 (5 %ig) und 9 ml Zitratpuffer (0,1 M, pH 6) neutralisiert. Um das Hydrolysat auf einen pH-Wert von etwa 6 einzustellen, wurde 0,5 ml dieser Lösung nochmals mit

3 ml Zitratpuffer versetzt. Nach Zugabe von 4 ml Isopropylalkohol wurde der Hydroxyprolinanteil im Knochenmehl mit 1 ml Chloramin T oxydiert. Nach einer Verweildauer von 4 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung in einem Eisbad abgekühlt und mit 10 ml Ehrlichschem Reagenz gut vermischt. Danach wurden die Proben 2 Minuten lang in einem kochenden Wasserbad erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktion wurde nach 90 Minuten bei 565 nm gegen den Leerwert gemessen.

2.6 STATISTISCHE VERFAHREN

Die Konzentrationen an Calzium und Magnesium bestimmten wir aus den jeweiligen Eichwerten über Regressionsgeraden. Die Phosphat- und Hydroxyprolinmengen wurden mit den zur Meßreihe gehörenden Werten von Standard und Leerprobe errechnet.

Mittelwert, Streuung und Signifikanz der Differenz der Einzelwerte wurden folgendermaßen ermittelt:

Arithmetischer Mittelwert: $\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$

Streuung: $S = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \bar{x}\,\Sigma x}{n-1}}$

t-Test: $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$

(ungebundene Stichproben)

3. ERGEBNISSE

3.1 GEWICHTSVERLAUF

Das Verhalten der Wachstumsrate wird durch die Gewichtskurve der einzelnen Kollektive - wie folgende Abbildung (Abb. 4) zeigt - dokumentiert. Das Einzelgewicht der Tiere wurde durch regelmäßiges Wiegen der Ratten an jedem 2. Tag ermittelt.

Bei den frei ernährten Ratten zeigt die EAS-Gruppe nach 11 Tagen den größten Gewichtszuwachs (n = 8, 103,0 $\pm$ 1,3 %), nach 29 Tagen wird jedoch ein Abfall bis auf das Ausgangsgewicht (100,5 $\pm$ 1,5 %) feststellbar, dem schließlich ein Wiederanstieg des Körpergewichts gegen Versuchsende auf ein Maximum von 104,5 $\pm$ 1,1 % folgt. Die Körpergewichtszunahme des KS-Kollektivs ist initial gering (n = 8, 100,5 $\pm$ 0,8 %), am 8. Tag fällt sogar das Körpergewicht unter das Ausgangsgewicht ab und bleibt für weitere 13 Tage unverändert (99,5 $\pm$ 1,0 %), um schließlich wieder bis zu einem Endwert von 102 $\pm$ 1,0 % anzusteigen. Das Körpergewicht des PA-Kollektivs zeigt von Anfang an einen Abfall bis zum 29. Tag (n = 8, 96,5 $\pm$ 1,3 %), dann steigt es bis zum 41. Tag wieder leicht an (97,0 % $\pm$ 1,0 %). Das Ausgangskörpergewicht wird während der gesamten Versuchsdauer nicht mehr erreicht.

Bei den mangelernährten Ratten zeigen alle 3 Kollektive zunächst einen Abfall des Körpergewichts unter den Ausgangswert (PA: n = 12; 99,5 $\pm$ 1,1 %; EAS: n = 12; 99,0 $\pm$ 0,9 %; KS: n = 12; 96,4 $\pm$ 1,0 %), dann steigt in allen Kollektiven das

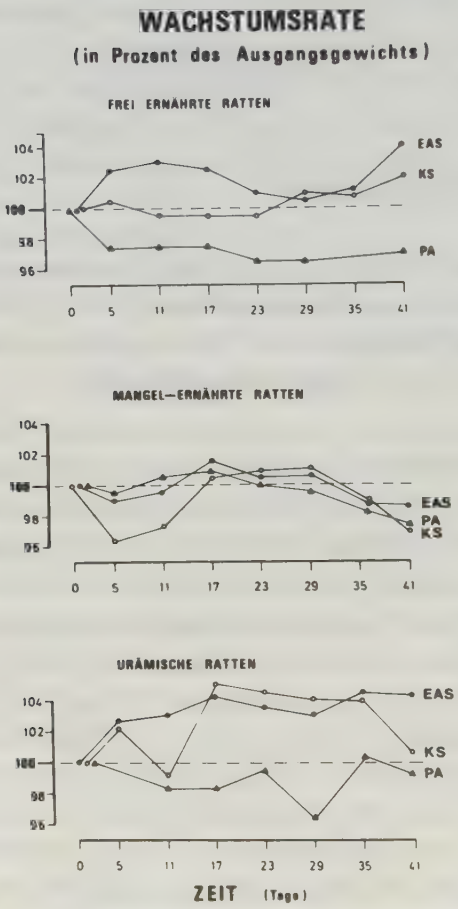

Abb. 4: Gewichtskurven der 3 Einzelkollektive unter dem Einfluß modifizierter Kostform. Das Ausgangsgewicht ist jeweils als 100 % gesetzt

Körpergewicht wieder an und übertrifft schließlich den Ausgangswert (PA: 101,0 ± 0,9 %; EAS: 101,5 ± 1,0 %; KS: 101,0 ± 0,6 %), im weiteren Verlauf jedoch stellt sich ein erneuter Gewichtsverlust gegen Versuchsende ein (PA: 97,4 ± 1,1 %; EAS: 98,5 ± 1,4 %; KS: 97,0 ± 0,9 %).

Alle drei Kollektive der urämischen Ratten weisen zunächst eine Körpergewichtszunahme auf (PA: n = 12; 101,9 ± 2,9 %; EAS: n = 12; 104,2 ± 2,4 %; KS: n = 12; 105,1 ± 2,0 %), der nach dem 17. Tag eine leichte Körpergewichtsabnahme im EAS- sowie KS-Kollektiv folgt. Das PA-Kollektiv zeigt schon nach dem 5. Tag einen Körpergewichtsabfall mit einem Minimalgewicht von 98,1 ± 2,4 %, ihm folgt ein erneuter Anstieg (106,0 ± 3,2 %), das Endgewicht beträgt schließlich 99,4 ± 2,8 %.

Eine orientierende Übersicht über das Gewichtsverhalten (in Gramm) gibt Abb. 5.

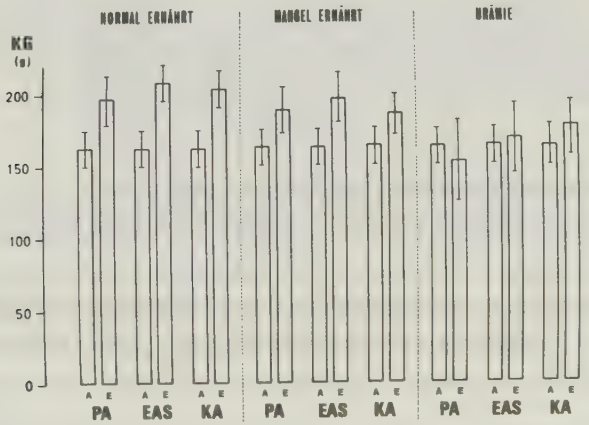

Abb. 5: Verhalten des Körpergewichts (KG) der 3 Einzelkollektive unter Berücksichtigung ihres Absolutgewichtes (in Gramm). Während sich in normalernährten und mangelernährten Kollektiven die Ausgangsgewichte (A) und Endgewichte (E) signifikant voneinander unterscheiden, sind diese Differenzen in urämischen Kollektiven ohne signifikanten Wert

3.2 BLUTCHEMISCHE BEFUNDE

Die Harnstoff-N-Konzentration (Abb. 6) lag bei den 5/6-nephrektomierten Kollektiven mit einem Durchschnittswert von 66 mg/dl erwartungsgemäß deutlich über den Werten der Kontrollkollektive, die mit 20 mg/dl im Normbereich waren.

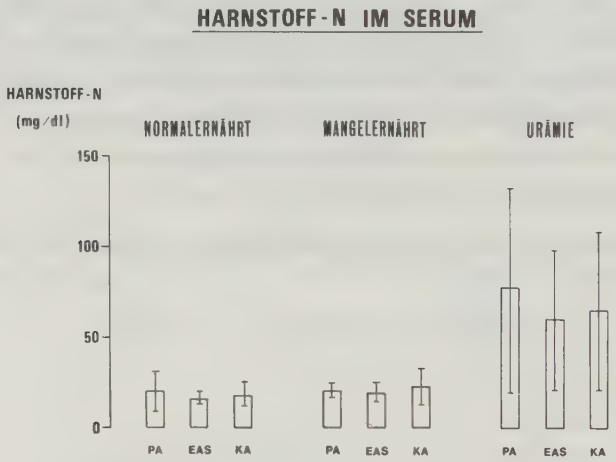

Abb. 6: Harnstoff-N-Gehalt des Serums (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$) der verschiedenen Rattenkollektive am Ende der Studie

Die Einzelwerte im normalernährten und mangelernährten Kollektiv unterschieden sich nicht signifikant untereinander, jedoch deutlich von den Werten des urämischen Kollektivs ($p < 0,05$).

Der Calciumgehalt (Abb. 7) des Serums zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Kollektiven.

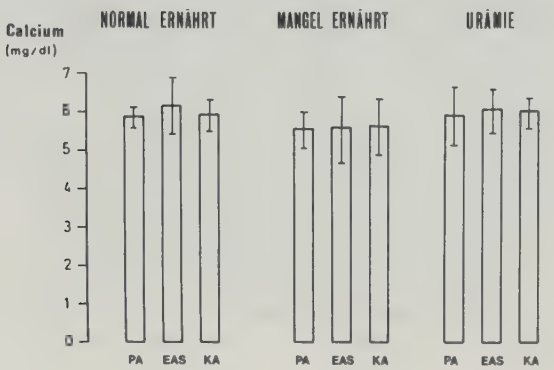

Abb. 7: Serumcalciumkonzentration der verschiedenen Rattenkollektive (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$). Es waren keine signifikanten Differenzen zwischen den verschiedenen Kollektiven nachweisbar

Die Serumphosphatwerte (Abb. 8) boten ein auffälliges Bild: Alle urämischen Tiere wiesen im Vergleich zu den normal ernährten Kontrolltieren, unabhängig von der Zusammensetzung der Diät, eine signifikant erhöhte Phosphatkonzentration auf; auch hatten die urämischen Tiere einen signifikant höheren Phosphatspiegel im Vergleich zu den mangelernährten Tieren der Kollektive, die Diät erhalten hatten.

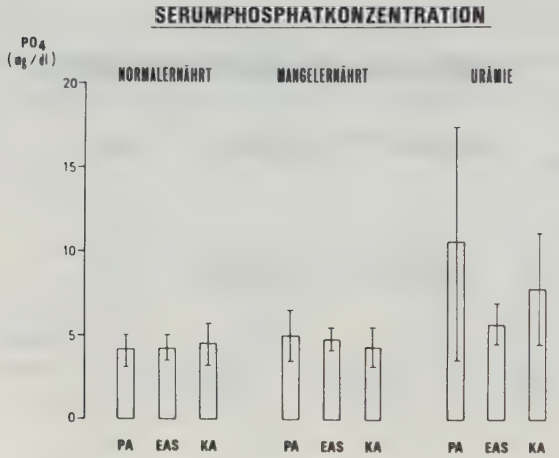

Abb. 8: Serumphosphatgehalt (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$) der verschiedenen Rattenkollektive

Signifikanzen:

PA-Kollektiv: ME/U $p < 0,05$
NE/U $p < 0,05$

EAS-Kollektiv: NE/U $p < 0,02$

KA-Kollektiv: ME/U $p < 0,01$
NE/U $p < 0,02$

Die Serum-Magnesium-Konzentration (Abb. 9) der urämischen Tiere war ohne Beziehung zur Zusammensetzung der Diät im Vergleich zu normal- und mangelernährten Tieren signifikant erhöht. Die Tiere aus mangelernährten Kontrollkollektiven wiesen wiederum eine signifikant erhöhte Konzentration bei Zusatz von KA im Vergleich zum Kollektiv ohne Zusatz bzw. mit Zusatz von EAS auf.

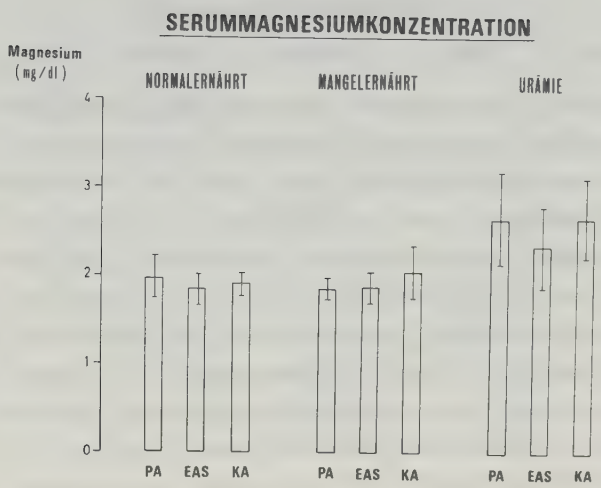

Abb. 9: Serummagnesiumgehalt (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$) der verschiedenen Rattenkollektive

Signifikanzen:

ME-Kollektiv:	PA/KA	p	$< 0,025$
	KA/EAS	p	$< 0,025$
PA-Kollektiv:	ME/U	p	$< 0,0005$
	NE/U	p	$< 0,0025$
EAS-Kollektiv:	ME/U	p	$< 0,0025$
	NE/U	p	$< 0,01$
KA-Kollektiv:	ME/U	p	$< 0,0025$
	NE/U	p	$< 0,0005$

3.3 KNOCHENCHEMISCHE, RÖNTGENOLOGISCHE UND HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE

Calcium

Alle urämischen Ratten hatten - ohne Beziehung zur Diätform - einen signifikant niedrigeren Calciumgehalt des Knochens im Vergleich zu den mangelernährten Tieren (Abb. 10). Bei Kollektiven, die lediglich Diät unter Zusatz von essentiellen Aminosäuren und Ketoanaloga erhalten hatten, fand sich wiederum ein signifikant niedrigerer Calciumgehalt bei den 5/6-nephrektomierten Tieren im Vergleich zu den normal ernährten Kontrolltieren. Andererseits war im Kollektiv mit Diät und Ketoanalogazusatz ein signifikant verminderter Calciumgehalt bei den mangelernährten Tieren im Vergleich zu den normal ernährten Tieren nachweisbar. Im normalernährten Kontrollkollektiv war der Calciumgehalt bei Tieren mit Diät, aber ohne Zusatz von essentiellen Aminosäuren oder Ketoanaloga signifikant niedriger als bei vergleichbaren Tieren mit Zusatz von essentiellen Aminosäuren und Ketoanaloga.

Phosphat

Unter den Kollektiven mit Diät, aber ohne Zusatz von essentiellen Aminosäuren und Ketoanaloga war die Phosphatkonzentration bei den normal ernährten Tieren im Vergleich mit den mangelernährten und den 5/6-nephrektomierten Tieren signifikant erniedrigt (Abb. 11). Nach Zusatz von Ketoanaloga war ein signifikant niedrigerer Phosphatgehalt bei den 5/6-nephrektomierten Tieren gegenüber den normal ernährten Ratten und den mangelernährten Ratten nachweisbar, die mangelernährten Tiere wiederum hatten einen signifikant geringeren Phosphatgehalt gegenüber den normal ernährten Ratten. Normal ernährte Tiere dagegen zeigten eine signifikante Abnahme des Phosphatgehalts in der Gruppe der nur mit Diät, d.h. ohne Zusatz, gefütterten Tiere im Vergleich zu

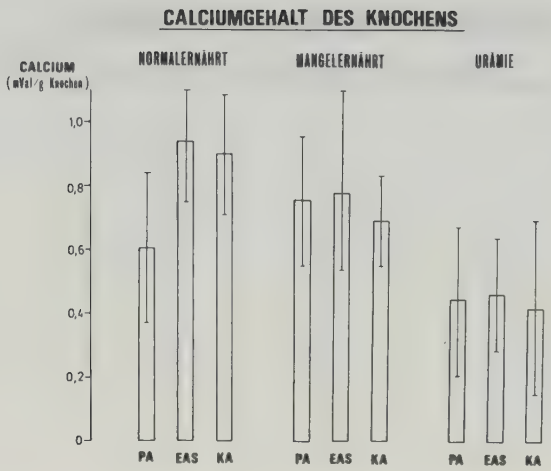

Abb. 10: Calciumgehalt des Knochens (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$) in den verschiedenen Rattenkollektiven

Signifikanzen: NE -Kollektiv: PA/KA $p < 0,025$
PA/EAS $p < 0,01$

PA-Kollektiv : ME/U $p < 0,0025$

EAS-Kollektiv: ME/U $p < 0,005$
NE/U $p < 0,0005$

KA-Kollektiv : ME/NE $p < 0,0125$
ME/U $p < 0,0025$
NE/U $p < 0,0025$

den Tieren, die essentielle Aminosäuren bzw. Ketoanaloga erhalten hatten. In der Gruppe der urämischen Ratten war der Phosphatgehalt der Tiere mit Diät allein und der Tiere mit Zusatz essentieller Aminosäuren im Vergleich zu den Tieren, die Ketoanaloga zusätzlich erhalten hatten, signifikant erhöht.

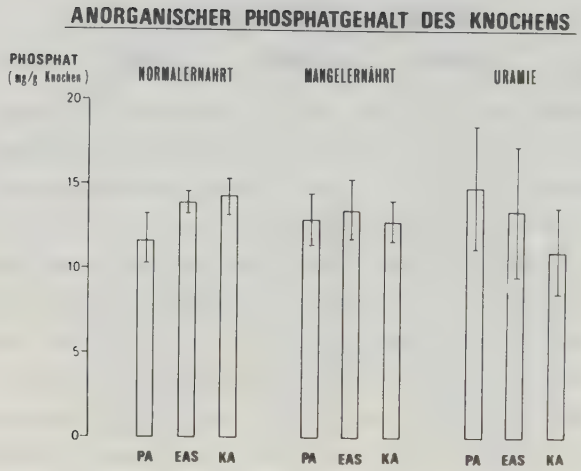

Abb. 11: Anorganischer Phosphatgehalt des Knochens (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$) der verschiedenen Rattenkollektive

Signifikanzen:	NE-Kollektiv:	PA/KA	$p < 0,0025$
		PA/EAS	$p < 0,0025$
	PA-Kollektiv:	ME/NE	$p < 0,05$
		NE/U	$p < 0,05$
	U-Kollektiv:	PA/KA	$p < 0,01$
		KA/EAS	$p < 0,05$
	KA-Kollektiv:	ME/NE	$p < 0,01$
		ME/U	$p < 0,025$
		NE/U	$p < 0,0025$

Hydroxyprolin

Im Kollektiv mit Diät, aber ohne Zusatz von essentiellen Aminisäuren oder Ketoanaloga fiel der signifikant niedrigere Hydroxyprolingehalt der urämischen Tiere gegenüber den normal ernährten und den mangelernährten Kontrolltieren auf (Abb. 12). Im Gegensatz dazu fanden sich

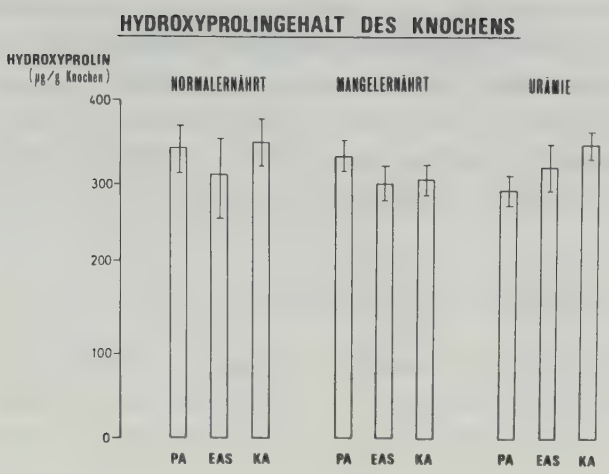

Abb. 12: Hydroxyprolingehalt des Knochens (Mittelwert $\pm s_{\bar{x}}$) der verschiedenen Rattenkollektive.

Signifikanzen:	ME-Kollektiv :	PA/KA	$p < 0,01$
		PA/EAS	$p < 0,025$
	PA-Kollektiv :	ME/U	$p < 0,0005$
		NE/U	$p < 0,0025$
	KA-Kollektiv :	ME/NE	$p < 0,0025$
		ME/U	$p < 0,0005$
	U-Kollektiv :	PA/KA	$p < 0,0005$
		KA/EAS	$p < 0,01$
	EAS-Kollektiv:	ME/U	$p < 0,0005$
		NE/U	$p < 0,05$

bei dem Diätkollektiv mit essentiellen Aminosäuren signifikant erhöhte Hydroxyprolinwerte der 5/6-nephrektomierten Tiere im Vergleich zu den normal ernährten und den mangelernährten Ratten. Das Diätkollektiv mit Zusatz von Ketoanaloga zeigte dagegen einen signifikant niedrigeren Hydroxyprolingehalt bei den mangelernährten Tieren im Vergleich zu den 5/6-nephrektomierten und den normal ernährten Tieren.

Die mangelernährten Tiere wiesen einen signifikant höheren Hydroxyprolingehalt des Knochens bei Tieren mit Diät, aber ohne Zusatzstoffen, gegenüber den Tieren, die Diät und essentielle Aminosäuren bzw. Ketoanaloga erhalten hatten, auf. Bei vergleichender Analyse der urämischen Tiere war der Hydroxyprolingehalt des Knochens bei Tieren mit Diät und Ketoanaloga signifikant höher als bei den Tieren mit Diät allein oder mit Zusatz von essentiellen Aminosäuren.

Gehalt an organischen Substanzen

Unabhängig von der Zusammensetzung der Diät war der Gehalt an organischer Substanz im Knochen in den normal ernährten und mangelernährten Kollektiven gegenüber den urämischen Kollektiven signifikant erhöht (Abb. 13). Außerdem war bei den Tieren mit Diät und Zusatz von essentiellen Aminosäuren bzw. Ketoanaloga ein signifikant höherer Gehalt an organischen Substanzen im Knochen beim Vergleich der normal ernährten Tiere mit den mangelernährten Tieren nachweisbar.

Röntgenologische Befunde

In allen Kollektiven war röntgenologisch keine Änderung der Knochenstruktur oder der gemessenen Dimensionen des Femurs erkennbar. Auch die Berechnung des Femoral Core (Barnett und Nordin, 1) ergab keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der einzelnen Tierkollektive.

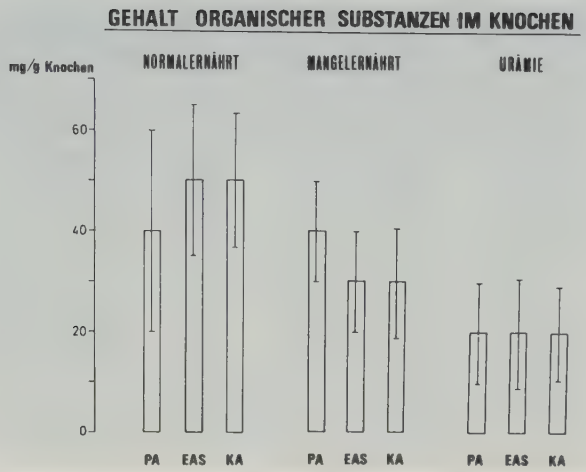

Abb. 13: Gehalt organischer Substanzen im Knochen (Mittelwert $\pm$ $s_{\bar{x}}$) der verschiedenen Rattenkollektive

Signifikanzen:	PA-Kollektiv:	ME/U	$p < 0,0005$
		NE/U	$p < 0,05$
	KA-Kollektiv:	ME/NE	$p < 0,0025$
		ME/U	$p < 0,01$
		NE/U	$p < 0,0005$
	EAS-Kollektiv:	ME/NE	$p < 0,025$
		ME/U	$p < 0,005$
		NE/U	$p < 0,0005$

Die folgende Abbildung (Abb. 14) dient der Dokumentation der Aufnahmetechnik und des Aussehens der Einzelknochen auf dem Röntgenspezialfilm.

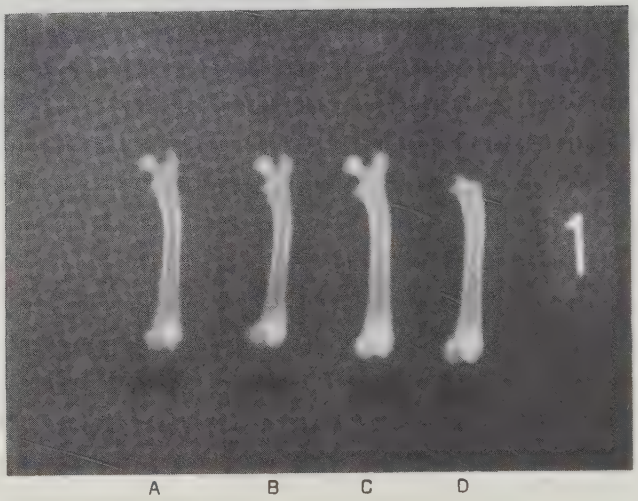

Abb. 14: Röntgenaufnahmen des Knochens verschiedener Tierkollektive

A Normal ernährtes Tier mit Zusatz essentieller Aminosäuren

B Mangelernährtes Tier mit Zusatz essentieller Aminosäuren

C Normalernährtes Tier mit Zusatz essentieller Aminosäuren

D Urämisches Tier mit Zusatz essentieller Aminosäuren

Die Werte der röntgenmorphometrischen Untersuchungen sind in der folgenden Abbildung (Abb. 15) dargestellt.

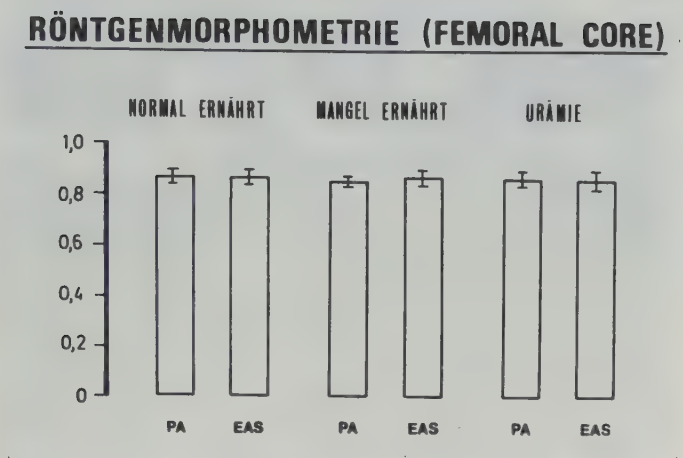

Abb. 15: Vergleichende Darstellung des von Barnett und Nordin (1) angegebenen Parameters Femoral Core bei den verschiedenen Tierkollektiven. Alle Ergebnisse waren nicht signifikant different

Histologische Befunde

Histologisch waren lichtmikroskopisch keine wesentlichen Strukturveränderungen im Bereich der Knorpel-Knochengrenze beim Vergleich der Einzelkollektive nachweisbar, eine histomorphometrische Methode stand nicht zur Verfügung. Zur Dokumentation des histologischen Bildes ist in der folgenden Abbildung (Abb. 16, 17, 18) jeweils repräsentativ für eines der frei großen Kollektive ein Längsschnitt durch das proximale Tibiaende wiedergegeben.

Von oben nach unten erscheint in der Abbildung die Struktur des Epiphysenspaltes: im oberen Teil die Spongiosa der Epiphyse, daran angrenzend Teile des Wachstumsknorpels und die primäre Spongiosa

Abb. 16: Histologisches Bild der proximalen Tibia-Epiphysenfuge eines normal ernährten Tieres mit Zusatz essentieller Aminosäuren

der Metaphyse im unteren Abschnitt der Abbildung. In der Knorpelzone selbst finden sich die Schicht der germinativen und proliferativen Zellen der Knorpelbildung (Säulenknorpel) sowie die hypertrophen Zellen der Knorpeltransformation (Blasenknorpel). Beim Vergleich dieser Strukturen mit denen der Abbildungen 17 und 18 ist kein wesentlicher Unterschied zu erkennen.

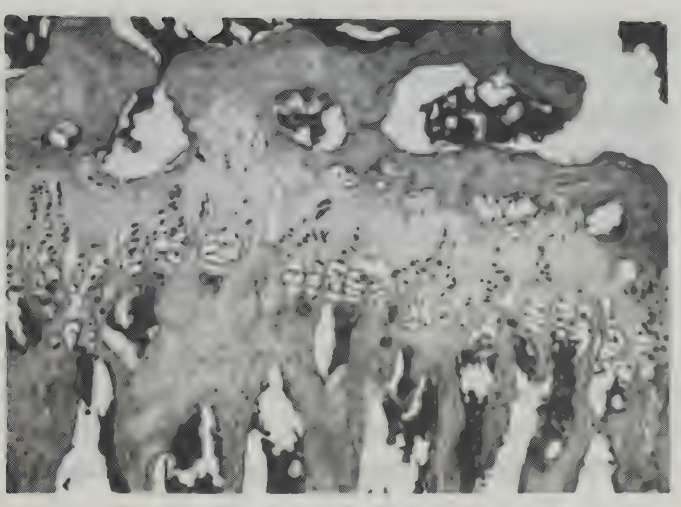

Abb. 17: Histologisches Bild der proximalen Tibiaepiphysenfuge eines mangelernährten Tieres mit Zusatz essentieller Aminosäuren

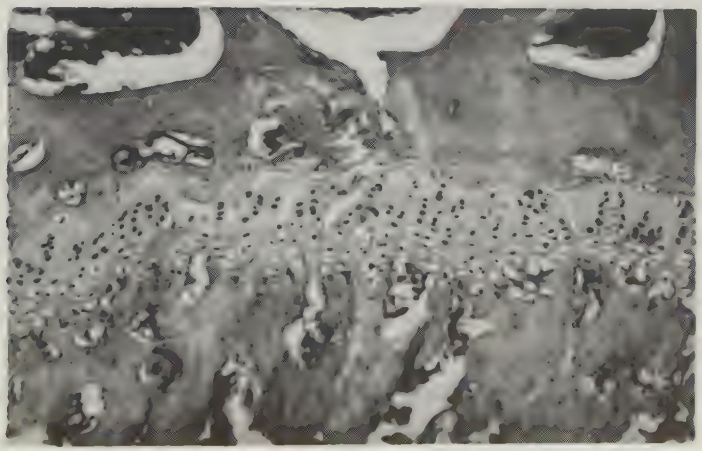

Abb. 18: Histologisches Bild der proximalen Tibiaepiphysenfuge eines urämischen Tieres mit Zusatz essentieller Aminosäuren

4. DISKUSSION

4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die zusammenfassende Analyse der Untersuchungsergebnisse zeigt beim Vergleich der drei großen Gruppen normal ernährter, mangelernährter und urämischer Ratten, daß bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz der Calciumgehalt des Knochens deutlich verringert ist, der Phosphatgehalt dagegen sich nicht wesentlich ändert; der Hydroxyprolingehalt des Knochens wird nicht alteriert, der Gehalt an organischen Substanzen ist jedoch auffällig reduziert. Die persistierende Proteindepletion verändert die Calcium-, Phosphat- und Hydroxyprolinkonzentration im Knochen nicht, der Gehalt an organischen Substanzen ist leicht verringert.

Die Aufschlüsselung der Ergebnisse nach möglicherweise modifizierenden Einflüssen verschiedener Diätformen, d.h. nach Zusatz von essentiellen Aminosäuren oder deren Ketoanalogen zum Futter, auf Serum- und Knochenparameter vermittelt insofern ein klares Bild, als sich keine signifikante Beeinflussung der einzelnen knochenchemischen Parameter im Vergleich zum gruppeneigenen Kontrollkollektiv eruieren läßt. Vor allem läßt sich die Verarmung des Knochens an Calcium und organischen Substanzen auch durch eine konsequente Substitution von Eiweißbausteinen nicht verbessern. Der Abfall des Serumphosphatspiegels nach Gabe von essentiellen Aminosäuren und/oder Ketoanalogen - unter klinischen Bedingungen eine geläufige Beobachtung (9) - läßt sich auch im Tierexperiment reproduzieren. Die Frage nach dem Verbleib zirkulierenden anorganischen Phosphats - ein vermehrter

Einbau in die Knochenmatrix ließe sich vermuten - ist insofern klar zu beantworten, indem der Knochen offenbar nicht erkennbar remineralisiert wird und somit der Abfall des Serumphosphatspiegels nicht auf einen verstärkten Einbau von Phosphat in den Knochen beruhen kann.

Auch eine Analyse der Validität einzelner in dieser Studie verwendeter Untersuchungstechniken sollte an dieser Stelle angefügt werden. Trotz des großen technischen Aufwandes anatomischer Präparation, histologischer Untersuchung und röntgenologischer Dokumentation der Extremitätenknochen ließen sich keine Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Kollektive feststellen. Ob nun der Beobachtungszeitraum von 3 Monaten zu kurz war oder die verwendeten Methoden zu grob (im Falle der Röntgendarstellung) oder ohne Morphometrie (im Falle der histologischen Beurteilung) zu ungenau waren, läßt sich mit hinreichender Wahrscheinlichkeit nicht festlegen. Die o. a. Untersuchungsbefunde lassen jedoch schwerwiegende strukturelle Schäden durch die Proteindepletion oder die Urämie als unwahrscheinlich erscheinen.

4.2 KNOCHENSTOFFWECHSEL BEI PROTEINDEPLETION

Über die Folgen eines langfristigen Eiweißmangels auf den Knochenstoffwechsel des Menschen liegen nur wenige Mitteilungen vor. Higginson (10), wie auch andere Autoren (13), berichtet über Störungen der enchondralen Ossifikation bei Bantu-Kindern; in einer anderen Untersuchung wird ein schweres Defizit an kortikaler Knochensubstanz mitgeteilt (7).

Tierexperimentell sind besonders die Folgen des Eiweißmangels - häufig mit simultan modifiziertem Calciumgehalt im Nahrungsangebot - auf die Histologie und die Zusammensetzung des Knochens untersucht worden. Besonders deutlich belegen diese Studien eine Beeinträchtigung

der enchondralen Knochenbildung (6, 25): Die Ausdehnung der Knorpelzone ist verringert, indem der Eiweißmangel das Knorpelzellwachstum selbst offenbar schädigt.

Die Knochenappositionsrate ist bei Rhesusaffen deutlich vermindert (12), die Eiweißmangelsituation alteriert besonders die Osteoblastenpopulation, die - wie auch die Zellen des exokrinen Pankreas und der Leber - zu den Zellen mit einem hohen Eiweißstoffwechsel gezählt werden müssen, sie sind sehr reich an rauhem endoplasmatischen Retikulum (3, 25). Die Folgen können sich als Reduktion der Osteoidbildung oder des Osteoidabbaus manifestieren oder den Mineralstoffwechsel des Knochens selbst betreffen. Blutchemische Korrelate fehlen meist (Calcium, Phosphor, alkalische Phosphatase), einige Autoren haben eine Hypocalcämie beobachtet (20). Die Zunahme der Knochenresorption bei Proteinmangel, also eine Störung des Knochenstoffwechsels auf der Abbauseite, ist beim Menschen durch eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung im Harn belegt (37). Die Osteoklasten selbst sind jedoch weniger als die Osteoblasten betroffen, eine stärkere Osteoidbildung wird nicht beobachtet (24).

Aus pathologisch-anatomischer Sicht ist eine Osteoporose bei Affen belegt (37), nach El-Maraghi (4) handelt es sich um eine sog. Matrix-Osteoporose im Gegensatz zur Mineral-Osteoporose, die bei jungen Ratten als Folge einer calciumarmen Kost bei normaler Proteinzufuhr beobachtbar ist (4). Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Ursachen der Osteoporose nicht eindeutig geklärt; als möglicher initialer Prozeß wird eine funktionelle Alteration der pluripotenten Osteoprogenitorzelle, der Stammzelle der Osteoblasten und Osteoklasten, angesehen.

Auch das Wachstum der langen Röhrenknochen bleibt zurück, der Knochen erscheint rarifiziert (24), nach Zusatz von isokalorischen Kohlenhydraten zum proteinarmen Futter bessert sich diese Wachstumsstörung, nicht jedoch nach Calciumgabe allein (24).

Der Calciummetabolismus erscheint deutlich beeinträchtigt: Der Pool austauschbaren Calciums ist reduziert und die Calciumakkretionsrate verringert (20, 30), die Inkorporation von Prolin in Hydroxyprolin ist gedrosselt. Auch die ossäre Calciumresorption ist leicht verringert (20) . Bemerkenswerterweise ist die intestinale Calciumabsorption bei Proteindepletion deutlich rückläufig, die Ausscheidung fäkalen Calciums ist erhöht (30).

Nach Le Roith et al. (20) ist als gemeinsamer Nenner dieser Veränderungen des Skelettes bei Proteinmangel eine fundamentale Störung im Calciumstoffwechsel anzusehen, indem die verminderte intestinale Calciumabsorption den Pool austauschbaren Calciums verkleinert und die ossäre Akkretionsrate verringert.

4.3 DAS SKELTT BEI URÄMIE

Die urämische Osteopathie erweist sich in ihrer Pathogenese als außerordentlich komplex, histologisch ist sie im Vergleich zur Eiweißmangelosteopathie vor allem durch eine Osteomalazie und eine Ostitis fibrosa charakterisiert. In der instabilen Calciumhomöostase hat sie ihren wichtigsten Schrittmacher, über humorale Gegenregulationsversuche (Parathormon, Vitamin D) werden zusätzliche metabolische Störungen in Gang gesetzt, die das Skelett morphologisch erheblich schädigen (8).

Untersuchungen über An- und Abbauvorgänge im urämischen Skelett (11, 29, 34) zeigen im Tierversuch erhebliche Störungen. Die Knochenbildung geht bei wachsenden Ratten unter dem Einfluß der Urämie deutlich zurück, eine Malnutrition läßt sich durch Paarfütterung ausschließen. Als ihre Ursachen können eine reduzierte Matrixbildung mit konsekutivem Rückgang der Mineralisationsrate angesehen werden, auch eine

qualitative Änderung der Matrix ist zu diskutieren. Außerdem ist eine Reduktion der Kollagensynthese und der Synthese saurer Mucopolysaccharide nachgewiesen worden (16, 17, 18). Ein weiterer wichtiger pathogenetischer Faktor ist der Vitamin D-Mangel bei chronischer Niereninsuffizienz, der bereits frühzeitig zu einer intestinalen Absorptionsstörung führen kann.

Auch die Resorptionsseite im Knochenstoffwechsel ist tangiert, die Zahl der Osteoklasten steigt rasch an (32); ob die Resorptionsrate selbst erhöht ist, ist bislang in Zweifel zu ziehen, quantitativ ist die Resorption eher reduziert.

Tierexperimentell ist eine verzögerte Umwandlung des Knorpels in die primäre Spongiosa und später in die sekundäre Spongiosa beobachtet worden (22), trotz geringer Zeichen eines Hyperparathyroidismus und eines ausgeglichenen Vitamin D-Spiegels im Serum findet sich eine gesteigerte Osteoidakkumulation.

Das Längenwachstum ist beim Vergleich mit gesunden Ratten leicht reduziert, die Gewichtszunahme bleibt deutlich zurück, sodaß möglicherweise auch die veränderte Nahrungsaufnahme eine mitursächliche Rolle in der Pathogenese der Wachstumsretardierung spielt (22).

4.4 AMINOSÄURENSUBSTITUTION BEI URÄMIE: KURATIVER ODER METABOLISCHER EFFEKT?

Die Eiweißintoleranz des urämischen Organismus - infolge gestörter Ausscheidung der Stoffwechselprodukte zugeführten Eiweißes oder degradierten Eiweißes aus endogenen Quellen - bedingt eine Fülle klinischer Symptome, die allgemein als Urämiesyndrom bezeichnet werden: Übelkeit, Erbrechen, Anämie, Neuropathie u. a. nehmen mit zunehmender Niereninsuffizienz deutlich zu. Blutchemisch lassen sich

diese schweren metabolischen Veränderungen an der Azotämie, Azidose, Hyperkaliämie und Hyperphosphatämie deutlich ablesen.

Aus dieser schweren Derangierung des gesamten Stoffwechsels resultiert die Forderung einer proteinarmen Kost, um den Grad der Intoxikation zu lindern, wenngleich die katabole Stoffwechsellage ein Minimalangebot an hochwertigem, d.h. an essentiellen Aminosäuren-reichem Protein, unumgänglich ist. Zwei Diätformen haben sich in letzter Zeit unter klinischen Bedingungen besonders gewährt: (1) Die selektiv proteinarme Diät (in Deutschland als sog. Kartoffel-Ei-Diät (14, 15) bekanntgeworden) sowie die (2) nicht-selektiv proteinarme Diät in Kombination mit essentiellen Aminosäuren und/oder deren Ketoanaloga. Die unter (2) genannte Form wurde hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Knochenstoffwechsel in der vorliegenden Studie untersucht; sie verzichtet auf die Forderung nach hoher biologischer Wertigkeit des zugeführten Proteins, zur Eindämmung der Malnutrition ist die zusätzliche Gabe von essentiellen Aminosäuren oder deren Ketoanaloga ein unvermeidliches Postulat. Die mittlerweile industriell herstellbaren Preßlinge enthalten 8 essentielle Aminosäuren und Histidin bzw. ein Gemisch mit Keoanaloga.

Die Therapie mit α-Ketoanaloga der essentiellen Aminosäuren beruht auf der Vorstellung, endogenen Stickstoff unmittelbar zur Proteinsynthese heranzuziehen und damit den unter den Bedingungen der Urämie per se vergrößerten Stickstoffpool zu reduzieren (27). Nach den Untersuchungen von Chow und Walser (2) werden einige Ketoanaloga als N-freie Praecursoren der essentiellen Aminosäuren im Organismus unter N-Einbau in die korrespondierende Aminosäure umgewandelt, sie stehen damit für die Proteinsynthese zur Verfügung. Diese Aminierung erfolgt vorwiegend aus nicht-essentiellen Bausteinen, vor allem den Harnstoffpraecursoren Alanin und Glutamin (35).

Inzwischen ist diese Therapieform unter klinischen Bedingungen an verschiedenen europäischen Zentren geprüft worden, auch an der Medizinischen Unversitätsklinik Würzburg sind zwei Studien durchgeführt wor-

den (19, 28). Sie ergaben insofern günstige Resultate, als sie die Parameter des Eiweißstoffwechsels (Transferrin, Cholinesterase, C1q- und C3c-Komplement im Serum) besserten und die Hämoglobinwerte anstiegen. Gleichzeitig wurden jedoch in vereinzelten Fällen eine Hypercalcämie sowie ein Abfall des Serumphosphatspiegels beobachtet (9). Vor allem in dieser Beobachtung begründet sich das eigentliche Anliegen der vorliegenden Studie, indem sie nach einer Besserung des durch die Urämie tangierten Knochenstoffwechsels unter den Bedingungen einer modifizierten Proteinzufuhr fragt.

Mit gebotener Zurückhaltung lassen sich die in dieser Studie erhobenen Befunde wie folgt interpretieren: In der blutchemischen Dimension sind keine signifikanten Änderungen des Serumcalciumspiegels bei Urämie feststellbar, jedoch normalisieren sich die Serumphosphatspiegel, oder sinken zumindest signifikant unter der Zufuhr von essentiellen Aminosäuren und Ketoanaloga ab. Der Skelettstoffwechsel wird offenbar nicht positiv beeinflußt, das Wachstum der urämischen Ratten ist unter Zugrundelgung ihres Körpergewichts retardiert, eine Besserung der Phosphat-Hydroxyprolin- Ratio (33) ist nicht erkennbar, der organische Bestandteil in der Knochenmatrix bleibt unbeeinflußt niedrig.

Es ist bekannt, daß die Transaminierung der Ketoanaloga von der Höhe der Proteinzufuhr abhängig ist. Sie werden nur bei proteinarmer Kost transaminiert, sonst durch Oxydation abgebaut (2). Der Einwand, daß dieser Umstand in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurde, läßt sich durch die permanente Gabe eines proteinarmen Futters entkräften. Es bleibt somit nun eine Frage umfassender klinischer Forschung, ob der Zusatz von essentiellen Aminosäuren bzw. deren Ketoanaloga zu einer nicht-selektiv proteinarmen Kost den Knochenstoffwechsel entscheidend zu beeinflussen vermag.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung der Folgen einer chronischen Proteindepletion und einer chronischen Niereninsuffizienz haben sich im Langzeitversuch folgende Ergebnisse feststellen lassen:

1. Bei langfristiger Proteindepletion verändern sich die blutchemischen Parameter nicht, in der Gruppe der knochenchemischen Befunde war lediglich eine leichte Verminderung im Gehalt organischer Substanzen des Knochens feststellbar. Ein modifizierender Einfluß durch Substitution von essentiellen Aminosäuren oder ihren α-Ketoanaloga war nicht beobachtbar.

2. Unter den Bedingungen einer chronischen Niereninsuffizienz imponierte neben der obligaten Azotämie ein Anstieg des Serumphosphatwertes; unter den knochenchemischen Parametern fiel besonders eine Abnahme der Calciumkonzentration sowie des Gehaltes an organischen Substanzen auf. Bemerkenswerterweise vermochte der Zusatz von essentiellen Aminosäuren oder Ketoanaloga die knochenchemischen Befunde nicht zu bessern, blutchemisch war eine Abnahme des Phosphatspiegels zu erkennen.

3. Histologische Untersuchungen brachten keine Hinweise auf stärkere strukturelle Schäden bzw. Läsionen im Bereich der Knorpel-Knochengrenze der Tibia; auch beim Vergleich, die Auswirkungen der Proteindepletion bzw. der chronischen Niereninsuffizienz auf den Knochen zu quantifizieren, konnten keine Differenzen

zwischen den einzelnen Kollektiven festgestellt werden.

4. Aus diesen Untersuchungen wird geschlossen, daß der Knochenstoffwechsel durch die Proteindepletion nur geringfügig, durch die drohende Niereninsuffizienz jedoch in der Dimension der organischen Bestandteile stärker alteriert wird. Ein kurativer Effekt der zusätzlich verfütterten essentiellen Aminosäuren oder ihrer Ketoanaloga hat sich nicht erkennen lassen, der Abfall des Serumphosphatspiegels ist als metabolischer Effekt ohne größere klinische Relevanz zu interpretieren.

Herrn Prof. Dr. med. H. A. KÜHN, ehemals Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. med. K. KOCHSIEK, Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Universitätsdozent Dr. med. E. HEIDBREDER für die Überlassung des Themas, sowie für die ständige Hilfsbereitschaft, mit der er mich bei der theoretischen und praktischen Bearbeitung des Themas angeleitet und unterstützt hat.

Frau MÜNCH, Frl. BRAND und Frl. SCHEUERMANN danke ich für die fachkundige Unterstützung bei analytischen und präparatorischen Problemen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1	BARNETT, E., NORDIN, B.E.C.	Radiological assessment of osteoporosis. Clin. Radiol. IX (1960), 166.
2	CHOW, K.W., WALSER, M.	Substitution of five essential amino acids by their alphaketo analogues in the diet of rats. J. Nutr. 104 (1974), 1028.
3	COOPER, A.R., MILGRAM, J.W., ROBINSON, R.A.	Morphology of the osteon. An electron microscopic study. J Bone Joint Surg (Amer) 4 SN: (1966), 1239.
3	EL-MARAGHI, N.R.H., PLATT, B.S., STEWART, R.J.C.	The effect of the interaction of dietary protein and calcium on the growth and maintenance of the bones of young, adult and aged rats. Br. J. Nutr. 19 (1965), 491.
5	FIRSCHEIN, H.E., SHILL, J.P.	The determination of total hydroxyproline in urine and bone extracts. Analyt. Biochem. 14 (1966), 296.
6	FOLLIS, R.H.J.	Some observations on experimental bone disease. CIBA foundation symposium on bone structure and metabolism. Churchill, London (1956), 249.
7	GARN, S.M., ROHMANN, C.G., BEHAR, M., VITERI, F., GUZHMAN, M.A.	Compact bone deficiency in protein-calorie malnutrition . Science 145 (1964), 1444.
8	HEIDBREDER, E., LÜKE, F., HEIDLAND, A.	Kollagenstoffwechsel und Mineralisation des urämischen Knochens - molekular-pathologische Aspekte der renalen Osteodystrophie. Klin. Wschr. 54 (1976), 341.

9	HEIDLAND, A., KULT, J., RÖCKEL, A., HEIDBREDER, E.	Evaluation of essential amino acids and keto acids in uremic patients on low-protein diet. Am. J. Clin. Nutr. 31 (1979), 1784.
10	HIGGINSON, J.	Studies on human bone from South African Bantu subjects. II. Histopathological changes in the ribs of South African Bantu infants. Metabolism 3 (1954), 392.
11	JAWORSKI, Z. F., VILLANUEVA, A. R., HITT, O., SARNSETHIRI, P., FROST, H. M.	Tetracycline-based study of bone remodelling in patients on maintenance dialysis. IV Intern. Congr. Nephrol. Stockholm, Sweden (1969), 24.
12	JHA, G. J., DEO, M. G., RAMALINGASWAMI, V.	Bone growth in protein deficiency. - A study in Rhesus monkeys . Amer. J. Pathol. 53 (1968), 1111.
13	JONES, P. R. M., DEAN, R. F. A.	The effect of Kwashiorkor on the development of the bones of the knee. J. Pediat 54 (1959), 176.
14	KLUTHE, R., QUIRIN, H., OECHSLEN, D.	Kartoffel-Ei-Diät bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz. Med. Klin. 62 (1967), 1020.
15	KOFRANYI, E., JEKAT, F.	Die Wertigkeit gemischter Proteine. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 335 (1964), 174.
16	KREMPIEN, B., RITZ, E.	Experimentelle mikromorphometrische Untersuchungen zur urämischen Osteodystropie. Verh. dtsch. Ges Path. 54 (1970), 397.
17	KREMPIEN, B., RITZ, E.	Experimentelle Untersuchungen zur Mineralisation und zur Matrixbildung bei urämischer Osteopathie. VII. Symp. Ges. Nephrol. (1970), 281 Stuttgart - New York: Schattauer (1971).

18	KREMPIEN, B., RITZ, E.	Experimental renal osteopathy. Israel. J. med. Sci. 7 (1971), 522.
19	KULT, J.	Serum Proteins during long-term substitution of essential amino acids. Renal Insufficiency, ed. by Heidland, A., Hennemann, H. M., Kult, J., Thieme, Stuttgart (1976).
20	LE ROITH, D., PIMSTONE, B. L.	Bone metabolism and composition in the protein-deprived rat. Clinical Science 44 (1973), 305.
21	MARSH, W. H., FINGERHUT, B., MILLER, H.	Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. Clinical Chemistry 11 (1965), 624.
22	MEHLS, O., RITZ, E., GILLI, G,, SCHMIDT-GAYK, H., KREMPIEN, B., KOURIST, H., WESCH, H., PRAGER, P.	Skeletal changes and growth in experimental uremia. Nephron 18 (1977), 288.
23	MÖHRING, J., MÖHRING, B.	Reevaluation of DOCA escape phenomenon. Am. J. Physiol. 223 (1972), 1237.
24	PLATT, B. S., STEWART, R. J. C.	Transverse trabeculae and osteoporosis in bones in experimental protein-calorie deficiency. Brit. J. Nutr. 16 (1962), 483.
25	PORTER, K. R., BONNEVILLE, M. A.	An introduction to the fine structure of cells and tissues (ed. 2). Lea, Philadelphia (1964).
26	RAABE, S.	Die Bedeutung routinemäßiger Phosphatbestimmungen im klinischen Labor. Rec. trav. chim. Pays-Bas. 74 (1955), 652.

27 RICHARDS, P., BROWN, C. L., HOUGHTON, B. J., THOMPSON, E. — Synthesis of phenylalanine and valine by healthy and uremic men. Lancet 2 (1971), 128.

28 RÖCKEL, A., ROLLER, F., KULT, J., HEIDLAND, A. — Comparative studies of potatoe egg diet and mixed low protein diet combined with essential amino acids in patients with endstage renal failure. Renal Insufficiency, ed. b. Heidland, A., Hennemann, H. M., Kult, J., Thieme, Stuttgart (1976).

29 SARNSETHIRI, P., JAWORSKI, Z. F., SHIMIZU, A. G., FROST, H. M. — New bone formation, osteoid seam thickness and appositional rate in patients undergoing renal dialysis. Arch. Path. 88 (1969), 49.

30 SHENOLIKAR, I. S., NARASINGA RAO, B. S. — Influence of dietary protein on calcium metabolism in young rats. Ind. Jour. Med Res. 56 (1968), 412.

31 STEWART, R. J. C., PLATT, B. S. — Arrested growth lines in the bones of pigs on low-protein diets. Proc. Nutr. Soc. 17 (1968) V.

32 TOFT, R. J., TALMAGE, R. V. — Quantitative relationship of osteoclasts to parathyroid function. Proc. Soc. ecp. Biol. (N. Y.) 103 (1960), 611.

33 TOUGAARD, I. — The degree of mineralization in normal bone tissue estimated as the phosphorus to hydroxyproline ratio. Scand. J. clin. lab. Invest. 35 (1975), 285.

34 VILLANUEVA, A. R., JAWORSKI, Z. F., HITT, O., SARNSETHIRI, P., FROST, H. M. — Cellular-level bone resorption in chronic renal failure and primary hyperparathyroidism. A tetracycline-based evaluation. Calc. Tiss. Res. 5 (1970), 288.

35 WALSER, M., COULTER, A. W., DIGHE, S. V. CRANTZ, F. — The effects of keto-analogues of essential amino acids in severe chronic uremia. J. Clin. Invest. 52 (1973), 673.

36 WALSER, M. Nutritional effects of nitrogen-free analogues of essential amino acids. Life Sci. 17 (1975), 1011.

37 WHITEHEAD, R. G. Hydroxyproline creatinine ratio as an index of nutritional status and rate of growth. Lancet 2 (1965), 567.

7. ANHANG

TABELLARISCHE ZUSAMMENSTELLUNG DER AUSGEWERTETEN UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Tabelle 1: Ergebnisse der Serumanalyse (Mittelwert $\pm s_{\bar{x}}$)

Kollektiv	Harnstoff-N (mg/dl)	Calcium (mg/dl)	Phosphat (mg/dl)	Magnesium (ml/dl)
NE + PA	19,86 ± 10,15	5,94 ± 0,3	4,15 ± 0,95	1,95 ± 0,19
NE + EAS	16,5 ± 2,43	6,24 ± 0,56	4,25 ± 0,72	1,83 ± 0,18
NE + KA	17,25 ± 6,72	5,98 ± 0,37	4,65 ± 1,4	1,89 ± 0,12
ME + PA	20,04 ± 3,32	5,66 ± 0,38	5,01 ± 1,52	1,85 ± 0,11
ME + EAS	19,82 ± 4,3	5,66 ± 0,79	4,87 ± 0,8	1,86 ± 0,14
ME + KA	21,88 ± 10,72	5,68 ± 0,67	4,35 ± 1,2	2,07 ± 0,34
U + PA	76,39 ± 62,59	5,95 ± 0,83	10,54 ± 7,38	2,66 ± 0,5
U + EAS	57,8 ± 40,17	6,14 ± 0,54	5,63 ± 1,28	2,34 ± 0,46
U + KA	64,59 ± 44,64	6,07 ± 0,33	7,75 ± 3,29	2,66 ± 0,45

Tabelle 2: Ergebnisse der knochenchemischen Analyse (Mittelwert $\pm s_{\bar{x}}$)

Kollektiv	Calcium (mVal/g)	Phosphat (mg/g)	OH-Prolin (µg/g)	Org. Subst (g/g)
NE + PA	0,604 ± 233,55	11,58 ± 1,48	341,65 ± 27,80	0,04 ± 0,02
NE + EAS	0,938 ± 214,67	13,95 ± 0,55	311,17 ± 65,43	0,05 ± 0,01
NE + KA	0,899 ± 223,54	14,14 ± 1,01	349,96 ± 26,94	0,05 ± 0,01
ME + PA	0,754 ± 205,76	12,92 ± 1,59	334,62 ± 16,17	0,04 ± 0,01
ME + EAS	0,768 ± 302,96	13,37 ± 1,53	311,17 ± 29,51	0,03 ± 0,01
ME + KA	0,687 ± 151,82	12,83 ± 1,04	313,00 ± 22,65	0,03 ± 0,01
U + PA	0,447 ± 231,73	14,87 ± 3,79	297,57 ± 19,19	0,02 ± 0,01
U + EAS	0,460 ± 180,41	13,38 ± 3,88	323,65 ± 29,08	0,02 ± 0,01
U + KA	0,418 ± 281,71	11,00 ± 2,47	350,56 ± 18,21	0,02 ± 0,01

Die Signifikanzen sind jeweils in den Legenden der Abbildungen genannt.

LEBENSLAUF

Am 12. Juni 1952 wurde ich in Schleswig geboren.

Nach Schulbesuch in Fürstenfeldbruck, Münster in Westfalen und Schwabach bei Nürnberg erhielt ich am 19. Juni 1971 vom Adam Kraft Gymnasium Schwabach das Zeugnis der Reife.

Vom SS 1972 bis zum WS 1978 studierte ich Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Am 29. Mai 1979 bestand ich den 3. Teil des Staatsexamens.

Vom 1. Juli 1979 bis 30. September 1980 diente ich als wehrpflichtiger Truppenarzt bei der Bundeswehr.

Stephan Funk

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80